

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Nikol Baloghová

Rakovina střevního epitelu a myší modely tohoto onemocnění
Intestinal cancer and mouse models of the disease

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Lucie Tůmová

Praha, 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4. 5. 2014

Podpis

Poděkování

V první řadě děkuji své školitelce Mgr. Lucii Tůmové za cenné rady a trpělivý přístup nejen při psaní bakalářské práce, ale i při mém zaškolování do práce v laboratoři. Dále děkuji panu Michalu Dibusovi za psychickou podporu, kritické připomínky a pomoc s úpravou obrázků. Děkuji také své rodině za finanční i psychickou podporu při studiu.

Abstrakt

Rakovina střevního epitelu je závažným a častým onemocněním. Pro správné pochopení mechanismu jejího vzniku je důležité znát jak strukturu střevního epitelu, tak signální dráhy, které udržují homeostázu a regulují buněčnou proliferaci a diferenciaci. Rozvoj rakoviny střeva je vícestupňový proces, jehož počátek i progresi doprovází řada změn na molekulární úrovni. Geneticky upravené myši jsou nezbytným nástrojem nejen při výzkumu vzniku a rozvoje rakoviny, ale i při vyvíjení účinnějších možností terapeutické léčby. Cílem této práce je popsat anatomii střeva včetně funkce signálních drah, shrnout nejběžnější mutace v rozvoji kolorektálního karcinomu u člověka a definovat existující myší modely tohoto onemocnění.

Klíčová slova: střevní epitel, kmenové buňky, signalizace, kolorektální karcinom, APC, myší modely

Abstract

Intestinal cancer is a serious and common disease. To understand the mechanisms of its development, it is important to know the structure of the intestinal epithelium, as well as the signalling pathways that maintain the homeostasis and regulate cell proliferation and differentiation. Development of the intestinal cancer is a multistep process in which many molecular events underlie initiation and progression of the disease. Transgenic mice produced by genetic engineering are essential tools in both research of the intestinal cancer initiation and progression and possible treatment strategies. The aim of this work is to describe the intestinal anatomy and the renewal of the intestinal epithelium including the role of multiple signalling pathways, to summarize the most common mutations conditioning human colorectal carcinoma development and to define the existing mouse models of the disease.

Key words: intestinal epithelium, stem cells, signalling, colorectal cancer, APC, mouse models

Seznam použitých zkratek

AK	Aminokyselina
AOM	Azoxymetan
APC	Adenomatous Polyposis Coli
Axin	Axis inhibition
Bmi1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR	Bone Morphogenetic Protein Receptor
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CBC	Crypt Base Columnar
CIMP	CpG (Cytosine-phosphate-Guanosine) Island Methylator Phenotype
CIN	Chromosomal Instability
CKI	Casein Kinase I
CKO	Conditional Knockout
CRC	Colorectal Cancer
Cre	Cyclization recombination
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
Dhh	Desert hedgehog
Dll	Delta-like
DMH	Dimethylhydrazin
DSS	Dextran Sulfát Sodný
Dvl	Dishevelled
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EphB	Ephrin type-B
ER	Estrogen Receptor
FAP	Familial Adenomatous Polyposis
Fz	Frizzled
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
HIC1	Hypermethylated In Cancer 1
HNPCC	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer
Hsp	Heat shock protein

Ihh	Indian hedgehog
Jag	Jagged
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
Lgr	Leucine-rich-repeat G-protein-coupled receptor
LOH	Loss Of Heterozygosity
<i>loxP</i>	locus of X-over of P1
LRP	Low-density lipoprotein-Receptor-related Protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
Min	Multiple intestinal neoplasia
MLH	Mut L Homolog
MMR	Mismatch Repair
MSH	Mut S Homolog
MSI	Microsatellite Instability
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase, Catalytic subunit Alpha
PMS	Post-Meiotic Segregation
Ptc	Patched
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
Shh	Sonic hedgehog
Smo	Smoothed
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TA	Transit Amplifying
TCF	T-Cell Factor
TGFβ	Transforming Growth Factor β

Obsah

1. Úvod	8
2. Střevo a střevní epitel	9
2.1 Buňky střevního epitelu	9
2.2 Kmenové buňky ve střevě	11
3. Signální dráhy řídící obnovu střevního epitelu.....	13
3.1 Signalizace Wnt/ β -katenin.....	13
3.2 Signalizace EphB/ephrin B.....	15
3.3 Signalizace Hedgehog	15
3.4 Signalizace Notch	15
3.5 Signální dráha BMP	16
3.6 Signalizace EGF	16
4. Rakovina střeva u člověka	17
4.1 Dědičné syndromy	17
4.2 Sporadické nádory	18
4.2.1 Chromozomální nestabilita.....	18
4.2.2 Nestabilita mikrosatelitů.....	21
4.2.3 Metylace ostrůvků CpG.....	21
5. Genetické myší modely.....	23
5.1 Myší modely s mutacemi v <i>Apc</i>	23
5.1.1 Myší modely s mutacemi v <i>Apc</i> vytvořenými pomocí systému <i>Cre-loxP</i>	25
5.2 Myší modely s mutacemi v genech MMR	28
5.3 Myší modely s mutacemi v dalších genech	28
6. Chemické modely karcinogeneze ve střevě	30
6.1 AOM.....	30
6.2 AOM/DSS	31
7. Závěr	32
Seznam použité literatury	33

1. Úvod

Kolorektální karcinom je jedním z nejčastějších onkologických onemocnění v České republice. Každoročně je nově diagnostikován až u 8000 lidí, čímž se ČR ve srovnání s ostatními zeměmi řadí mezi první místa žebříčku výskytu tohoto onemocnění. Počty nemocných ovšem ani v celosvětovém měřítku nejsou příznivé (IARC WHO; ÚZIS ČR). Je proto přirozené, že se na tento typ onemocnění soustředí značná část výzkumů. Pochopení základních mechanismů počátku a rozvoje kolorektálního karcinomu vede nejen k vývoji cílené léčby, ale i k předcházení vzniku tohoto onemocnění. Přestože se na tomto poli výzkumu dosáhlo značných úspěchů, stále ještě máme ve studiu kolorektálního karcinomu mezery. Pro jejich zaplnění se nepostradatelným studijním modelem stala myš (*Mus musculus*), a to díky své genetické podobnosti s lidmi a krátké generační době. Geneticky upravené myší modely a myši vystavené působení chemických karcinogenů jsou skvělým nástrojem nejen pro výzkum změn na molekulární úrovni při vzniku rakoviny, ale i pro výzkum a testování nových chemických látek, které by mohly sloužit jako terapie.

Jelikož je rakovina komplexní multifaktoriální onemocnění a její vznik je do jisté míry individuální u každého jedince, není v možnostech této práce detailně popsat problematiku vzniku kolorektálního karcinomu. Cílem této práce je popsat střevní epitel a signální dráhy, které přispívají k jeho udržování a obnově, dále poukázat na dosavadní poznatky o nejčastějších mutacích, které vznik kolorektálního karcinomu doprovázejí, a nakonec představit základní myší i chemické modely karcinogeneze ve střevě.

2. Střevo a střevní epitel

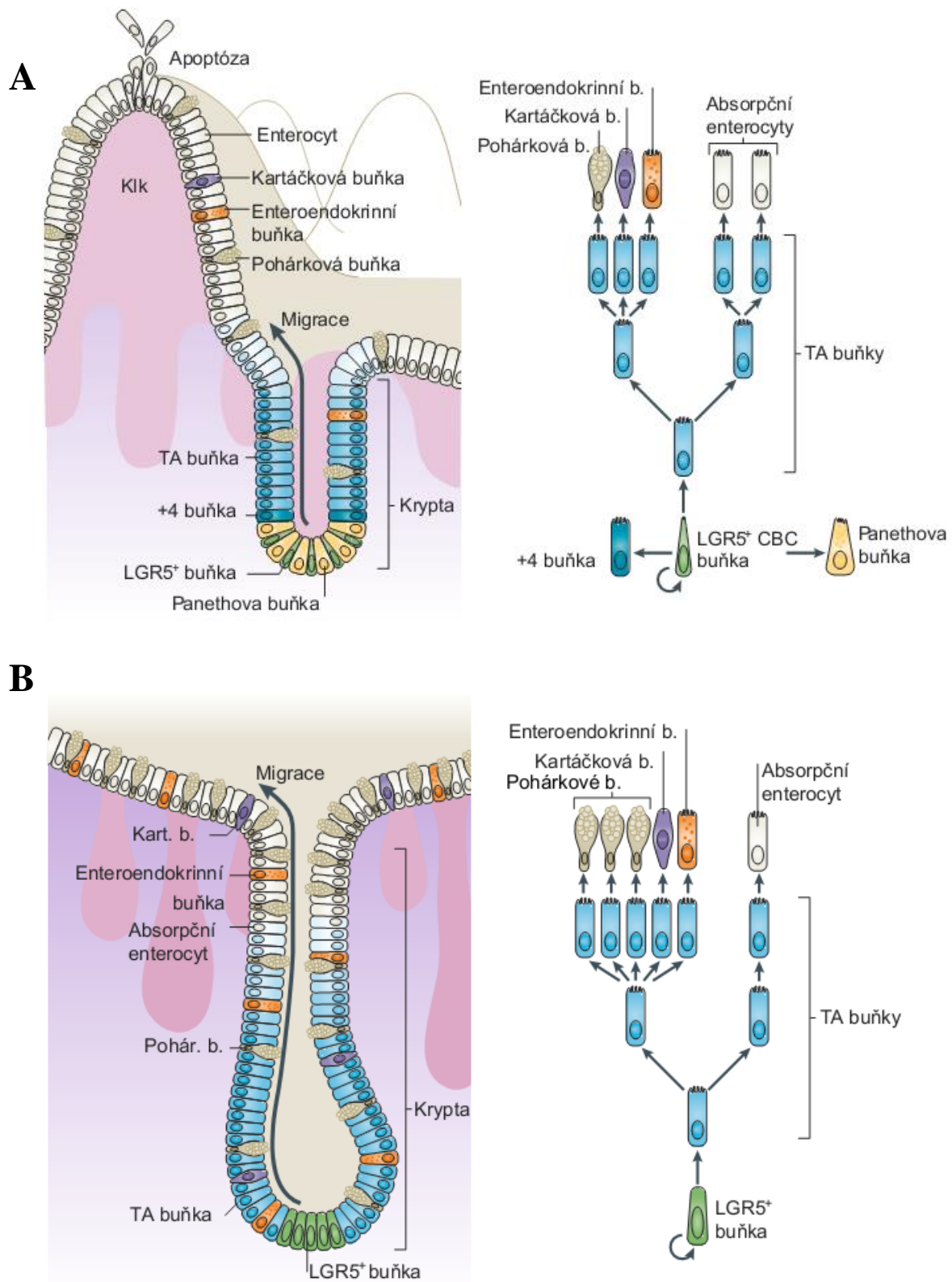
Střevní epitel hraje důležitou roli při trávení a vstřebávání živin a vytváří bariéru proti průniku patogenů do těla. Střevo můžeme anatomicky rozdělit na tenké, které se dále dělí na dvanáctník, lačník a kyčelník (*duodenum*, *jejunum*, *ileum*), a tlusté střevo (*colon*). Střevní trubici tvoří tři základní vrstvy. Vnější strukturou je hladké svalstvo a enterická nervová soustava, které jsou zodpovědné za peristaltické pohyby střeva. Střední vrstvu tvoří mezenchym mezi svalstvem a vnitřní epiteliální vrstvou, v němž se nachází krevní a lymfatické cévy a nervová vlákna. Vnitřní vrstva střeva je tvořena cylindrickým epitelem, který je u tenkého střeva organizován do invaginací, tzv. Lieberkühnových krypt, a výběžků, klků, které zvětšují povrch pro vstřebávání živin. Na rozdíl od tenkého střeva se v tlustém střevě vyskytují pouze krypty, které jsou větší (shrnutí v Barker et al., 2010; van der Flier and Clevers, 2009; viz Obrázek 1).

2.1 Buňky střevního epitelu

Na funkci střevního epitelu se podílejí čtyři hlavní typy buněk, a to Panethovy buňky, pohárkové buňky a enteroendokrinní buňky, které patří k sekrečním liniím, a absorpční buňky – enterocyty (shrnutí v Reya and Clevers, 2005).

Panethovy buňky se nacházejí na dně krypt, avšak pouze tenkého střeva, kde jsou mezi ně vmezeřeny kmenové buňky. Hlavní funkce Panethových buněk spočívá v regulaci mikrobiálního prostředí střeva, např. pomocí vylučovaných antibakteriálních látek defensinu a lysozymu. Tyto buňky ve střevě přetrvávají podstatně déle než ostatní diferencované buňky střevního epitelu (shrnutí v Barker et al., 2008). Důležitou úlohou Panethových buněk je také exprese ligandů účastnících se signalizace ve střevě, čímž Panethovy buňky přispívají k tvorbě niky buněk kmenových (Sato et al., 2011).

Hlavní úlohou pohárkových buněk je vylučování hlenu, který má usnadnit průchod stolice. Nejvíce zastoupeny jsou proto v kyčelníku a tlustém střevě, kde je stolice nejkompaktnější (shrnutí v Barker et al., 2010). Na bázi krypt tlustého střeva navíc existuje subpopulace pohárkových buněk, které zde zastávají funkci chybějících Panethových buněk a tvoří niku pro buňky kmenové (Rothenberg et al., 2012).



Obrázek 1: Uspořádání buněk a jejich migrace v kryptách a klcích tenkého střeva (A, vlevo) a kryptách tlustého střeva (B, vlevo). Schéma dělení a diferenciace buněk tenkého (A, vpravo) a tlustého střeva (B, vpravo). Převzato z Barker, 2014.

Enteroendokrinní buňky tvoří pouze malou část buněčných typů ve střevním epitelu. Jejich role spočívá ve vylučování různých hormonů, které se podílejí na procesech spojených

s řízením fyziologie střeva. Mezi tyto hormony patří mj. serotonin, sekretin nebo substance P (shrnutí v Barker et al., 2008).

Enterocyty jsou nejčastěji zastoupenými buňkami tenkého střeva, nejvíce se jich nachází v oblasti dvanáctníku. Jejich funkcí je absorpce živin z přijaté potravy a sekrece hydrolytických enzymů do lumen střeva (shrnutí v Barker et al., 2008).

Mimo tyto majoritní populace buněk se ve střevě nachází další typy buněk, jako jsou kartáčkové buňky nebo M buňky, které jsou součástí Peyerových plaků (Gerbe et al., 2012).

Všechny buňky střevního epitelu mají svůj původ v kmenových buňkách nacházejících se na bázi střevních krypt. Tyto buňky se dělí asymetricky a tím dávají vznik jedné kmenové buňce a jedné rychle se dělící (transit amplifying; TA) buňce. TA buňky migrují podél krypty a v průběhu migrace se až pětkrát rozdělí. Ve chvíli, kdy TA buňky dosáhnou báze klku (resp. třetiny délky krypty v tlustém střevě), terminálně diferencují v pohárkové buňky, enteroendokrinní buňky nebo enterocyty. Ty dále migrují podél klku a po dosažení jeho vrcholu (nebo vrcholu krypty u tlustého střeva) podléhají programované buněčné smrti, apoptóze, a jsou odvrženy do lumen střeva. Celý tento proces trvá 3-5 dní, čímž se střevní epitel řadí k nejrychleji obnovované tkáni těla. Na rozdíl od ostatních buněk střevního epitelu Panethovy buňky diferencují během migrace na spodek krypty tenkého střeva, kde se usídlují na 3-6 týdnů (shrnutí v Barker and Clevers, 2010; Marshman et al., 2002; Vries et al., 2010).

2.2 Kmenové buňky ve střevě

Kmenové buňky dospělého organismu jsou definovány dlouhověkostí a schopností vytvářet různé buněčné typy. Často mají multipotentní charakter (Barker et al., 2008).

Přesné umístění kmenových buněk ve střevních kryptách bylo, a stále ještě do jisté míry je, předmětem mnoha debat. Existovaly dvě hlavní teorie o jejich pozici. V té první měly kmenové buňky sídlit na čtvrtém místě od spodku krypty – buňky „na pozici +4“, zatímco předchozí tři pozice měly být obsazeny Panethovými buňkami (Potten et al., 1974). Druhý model byl založen na identifikaci malých nediferencovaných buněk vmezeřených mezi buňky Panethovy. Tyto buňky byly nazvány „crypt base columnar“ (CBC) (Cheng and Leblond, 1974).

Problémy s identifikací kmenových buněk spočívaly v nedostatku jejich známých specifických znaků. Předpokládalo se, že v kmenových buňkách dochází ke specifické expresi jednoho z cílových genů signální dráhy Wnt. Gen *Leucine-rich-repeat G-protein-coupled receptor 5 (Lgr5)* byl na rozdíl od ostatních přibližně 80 testovaných genů regulovaných signalizací Wnt exprimován jen v kryptách, ale ne na klcích tenkého střeva myši. Přitom se jeho exprese viditelně lišila od exprese genů specifických pro Panethovy nebo TA buňky. Gen *Lgr5* kóduje receptor spážený s G-proteinem, který obsahuje charakteristickou extracelulární doménu bohatou na leucin. V dospělé myši je tvořen v buňkách rozptýlených v oku, mozku, vlasovém folikulu, mléčné žláze, reprodukčních orgánech, žaludku a ve střevním traktu, kde se soustředí na spodek krypt tenkého i tlustého střeva. Gen *Lgr5* je specificky exprimován ve 4-8 buňkách CBC vmezeřených mezi Panethovy buňky v tenkém střevě. V tlustém střevě se jeho exprese soustředí v několika málo buňkách na bázi krypt. *Lgr5* tak byl stanovený jako první specifický znak buněk CBC. Další pokusy prokázaly, že buňky exprimující *Lgr5* (*Lgr5*⁺) reprezentují rychle se dělící populaci kmenových buněk tenkého i tlustého střeva – splňují definici dlouhověkosti i multipotentního charakteru (Barker et al., 2007). *Lgr5* je specifický pro mitoticky aktivní střevní kmenové buňky, které jsou aktivovány signální dráhou Wnt, značně se podílejí na regeneraci střevního epitelu a jsou citlivé na ozáření (Yan et al., 2012).

Dalším popsaným znakem specifickým pro buňky vykazující charakter kmenových buněk ve střevě byl B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 (*Bmi1*). Produktem genu *Bmi1* je protein stejného jména, člen rodiny proteinů Polycomb. Zpočátku se zdálo, že *Bmi1* je specificky exprimován převážně buňkami „na pozici +4“ v kryptě tenkého střeva (Sangiorgi and Capecchi, 2008). Tyto buňky můžou za fyziologických podmínek stimulovat vznik *Lgr5*⁺ buněk a v případě jejich poškození tvoří rezervní populaci kmenových buněk (Tian et al., 2011). Jiné výzkumy ale prokázaly, že k expresi *Bmi1* dochází i v buňkách CBC spolu s *Lgr5*, i když se jejich exprese vzájemně neovlivňují (Itzkovitz et al., 2012). Nicméně, na rozdíl od buněk *Lgr5*⁺ je *Bmi1* specifický především pro střevní kmenové buňky, které nejsou citlivé k výkyvům signalizace Wnt, k regeneraci střevního epitelu přispívají minimálně a jsou odolné vůči vysoké dávce záření. Z toho vyplývá, že ve střevním epitelu jsou přítomny minimálně dvě populace kmenových buněk, a to rychle se dělící, „aktivní“ *Lgr5*⁺ buňky a za normálních okolností klidové, „rezervní“ buňky, jejichž specifický znak stále ještě čeká na své odhalení (Yan et al., 2012).

3. Signální dráhy řídící obnovu střevního epitelu

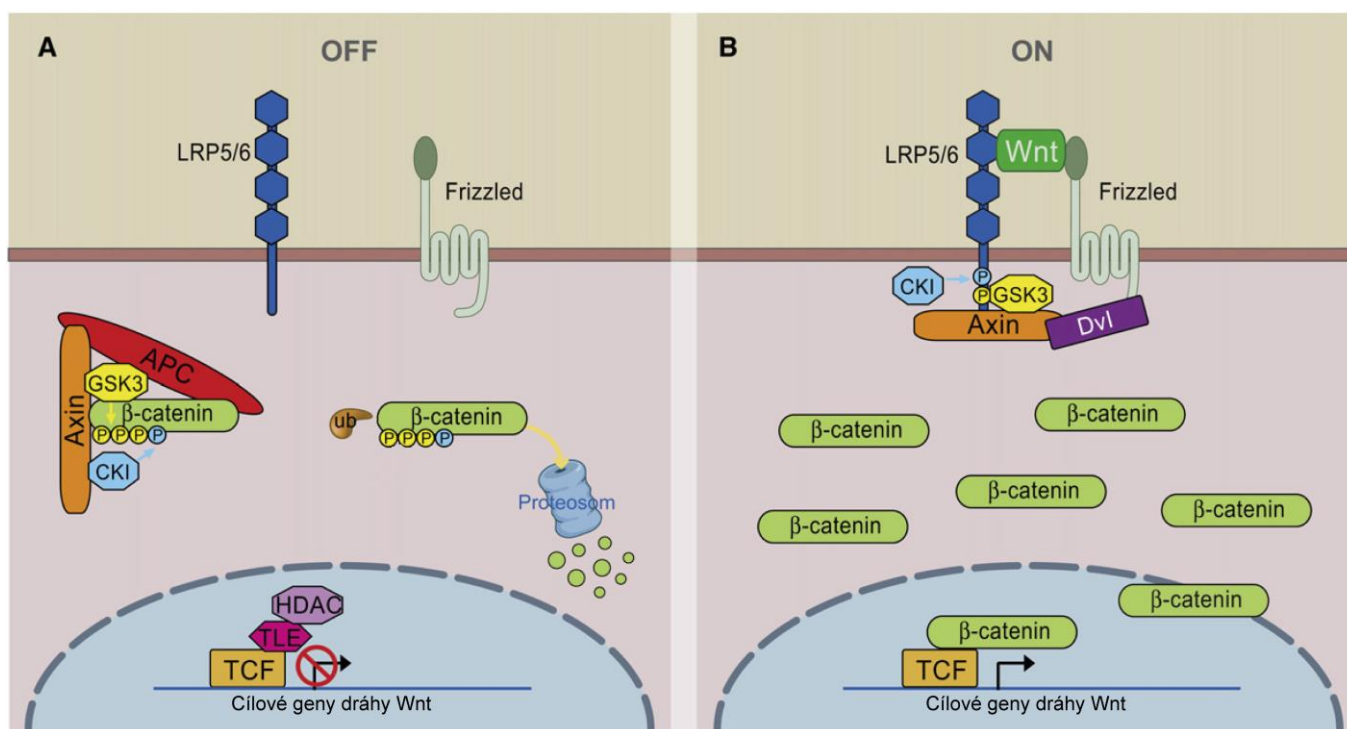
Signální dráhy ve střevě hrají významnou roli při řízení buněčné proliferace, diferenciace i buněčné smrti. Mezi ty nejdůležitější, podílející se na udržování střevní homeostázy, patří signální dráha Wnt/ β -katenin, dále dráhy Hedgehog, Notch, komunikační systém EphB (ephrin type-B receptor)/ephrin B ligand, signální dráha řízena kostním morfogenetickým proteinem (bone morphogenetic protein; BMP) a signalizace přes receptory epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor; EGFR) z rodiny tyrozin kináz (shrnutí v Krausova and Korinek, 2012). Poruchy správné funkce těchto signálních drah jsou ovšem často spojeny s nemocemi, zejména s rozvojem rakovinného bujení (Logan and Nusse, 2004).

3.1 Signalizace Wnt/ β -katenin

Kanonická signální dráha Wnt, ve které hraje velkou roli β -katenin, je jednou z nejdůležitějších signálních drah udržujících střevní kmenové buňky a regulujících jejich proliferaci (Logan and Nusse, 2004). U člověka je známo 19 glykosylovaných proteinů rodiny Wnt, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje od 39 do 46 kDa. Je pro ně charakteristická přítomnost 23-24 cysteinových zbytků, jejichž disulfidické vazby pravděpodobně přispívají ke správnému sbalení těchto proteinů (shrnutí v Miller, 2001). Panethovy buňky v tenkém střevě vylučují ligandy Wnt3, které aktivují signální dráhu Wnt v buňkách CBC (Sato et al., 2011).

Signální kaskáda Wnt je spuštěna navázáním ligandů Wnt na transmembránový receptor rodiny Frizzled (Fz) (Bhanot et al., 1996) a současně na koreceptory rodiny proteinů spojených s receptorem LDL (LDL-receptor-related protein; LRP), které jsou u člověka zastoupeny LRP5 a LRP6 (Wehrli et al., 2000). Poté, co se na membráně vytvoří komplex Wnt/Fz/LRP, váže k sobě protein Dishevelled (Dvl), který zprostředkuje navázání komponent degradačního komplexu β -kateninu (Gao and Chen, 2010). Degradační komplex se skládá z „proteinu inhibujícího osu“ (axis inhibition protein; Axin) a z proteinu „adenomatous polyposis coli“ (APC), které svojí strukturou tvoří jakési lešení pro ostatní proteiny

degradačního komplexu včetně β -kateninu, dále jsou součástí komplexu glykogen syntéza kináza 3 β (GSK3 β) (Hart et al., 1998) a kasein kináza I (CKI) (Gao et al., 2002). Ve chvíli, kdy signalizace Wnt neprobíhá, je β -katenin fosforylován degradačním komplexem a označen pro degradaci v proteasomu, čímž je neustále odbouráván a nehromadí se v cytoplasmě (Aberle et al., 1997). Po aktivaci signální dráhy Wnt je však degradační komplex navázán na receptory, což vede k inhibici fosforylace β -kateninu. Ten je stabilizován, hromadí se v cytoplasmě a poté vstupuje do jádra, kde tvoří komplexy s transkripčními faktory rodiny T-buněčných faktorů (T-cell factor; TCF)/lymfoidních zesilovacích faktorů (lymphoid enhancer factor; LEF). Tyto heterokomplexy poté aktivují transkripci cílových genů dráhy Wnt (MacDonald et al., 2009; viz Obrázek 2).



Obrázek 2: (A) Neaktivovaná signální dráha Wnt. β -katenin je fosforylován degradačním komplexem a označen pro odbourání v proteasomu. TCF interaguje s represory, čímž je potlačena transkripce cílových genů. (B) Ligandy Wnt aktivují signální dráhu svým navázáním na receptory. β -katenin není odbouráván, hromadí se v cytoplasmě a vstupuje do jádra, kde tvoří heterokomplexy s TCF/LEF, čímž spouští transkripci cílových genů. Převzato z MacDonald et al., 2009.

3.2 Signalizace EphB/ephrin B

Receptory EphB patří do rodiny tyrosin-kináz, na které se váží ephriny typu B (Frisén et al., 1999). Jejich exprese je stimulována signalizací Wnt. Receptory EphB2 jsou nejvíce exprimovány v proliferační části krypt a EphB3 na spodku krypt střeva. Ligandy receptorů EphB, ephriny-B1 a B2, jsou nejvíce exprimovány na rozhraní krypt a klků a jejich exprese se směrem ke spodku krypt snižuje. Tento gradientový komunikační systém je zodpovědný za správné uspořádání progenitorových i diferencovaných buněk. Při jeho nesprávné funkci dochází k promíchání těchto buněk a k roztroušení Panethových buněk podél krypt i klků (Batlle et al., 2002).

3.3 Signalizace Hedgehog

Do rodiny proteinů Hedgehog účastnících se signalizace u obratlovců patří proteiny Desert hedgehog (Dhh), Indian hedgehog (Ihh) a Sonic hedgehog (Shh) sloužící jako ligandy pro transmembránové receptory Patched (Ptc). Ty po jejich navázání přestanou potlačovat aktivitu receptoru Smoothened (Smo) spřaženého s G-proteinem, což vede ke spuštění transkripční aktivity cílových genů (shrnutí v Ingham et al., 2011). Signalizace Hedgehog reguluje proliferaci mezenchymálních buněk, které zpětně ovlivňují proliferaci a diferenciaci buněk epiteliálních pomocí signální dráhy BMP (Kosinski et al., 2010).

3.4 Signalizace Notch

Rodina proteinů Notch sestává ze čtyř transmembránových receptorů, a to Notch1-4, a pěti ligandů, Jagged 1 (Jag1), Jag2, Delta-like 1 (Dll1), Dll3 a Dll4. Signální kaskáda Notch je zahájena vazbou těchto ligandů na receptor zprostředkovanou přímým kontaktem buněk (shrnutí v Ranganathan et al., 2011). K přímému ovlivnění kmenových buněk dochází za pomoci ligandu Dll4, který je exprimován Panethovými buňkami (Sato et al., 2011). Signalizace Notch také rozhoduje o diferenciaci progenitorových buněk v buňky sekreční nebo absorpční linie. Při inhibici signalizace dochází k hyperplázii buněk sekreční linie (VanDussen et al., 2012).

3.5 Signální dráha BMP

Proteiny BMP jsou členy rodiny transformujících růstových faktorů β (transforming growth factor β ; TGF β), které jsou exprimovány mezenchymálními buňkami (He et al., 2004) a které se váží na serin-threonin kinázové receptory typu I a II (BMPRI a 2). To vede k fosforylaci transkripčních faktorů Smad, které ovlivňují expresi cílových genů (shrnutí v Miyazono et al., 2010). Důležitou úlohu sehrává signální dráha BMP ve stimulaci diferenciaci progenitorových buněk při jejich migraci k vrcholu krypty. Diferenciaci buněk však může být inhibována expresí antagonistů signalizace BMP, produkovaných myofibroblasty a buňkami hladkého svalstva v okolí krypt (Kosinski et al., 2007).

3.6 Signalizace EGF

Epidermální růstový faktor (EGF) svou vazbou na extracelulární část EGFR zahajuje různé signální kaskády regulující buněčnou proliferaci, mj. mitogenem aktivovanou protein kinázu (mitogen-activated protein kinase; MAPK), fosfoinositid 3-kinázu (phosphoinositide 3-kinase; PI3K)/Akt fosfolipázu C, nebo signální přenašeč a aktivátor transkripce (signal transducer and activator of transcription; STAT) (Lièvre et al., 2010). EGF je jako jeden z faktorů regulujících proliferaci kmenových buněk a přispívajících k udržení jejich kmenovosti také produkován Panethovými buňkami (Biteau and Jasper, 2011; Sato et al., 2011).

4. Rakovina střeva u člověka

Kolorektální karcinom (CRC) je v podstatě genetické onemocnění, ve většině případů způsobené především somatickými mutacemi v průběhu života přispívajícími ke vzniku tzv. sporadických nádorů. Při zděděné zárodečné mutaci tvořící predispozici k rozvoji CRC mluvíme o dědičných syndromech. Příčinou vzniku rakoviny však není jediná mutace, ale nahromadění několika genetických změn v průběhu let (Kinzler and Vogelstein, 1996; Vogelstein and Kinzler, 1993).

Dvě hlavní skupiny genů podléhajících genetickým změnám vedoucím k tumorigenezi jsou tumor supresorové geny a proto-onkogeny (Fearon and Vogelstein, 1990). Tumor supresorové geny kódují proteiny, které regulují buněčnou proliferaci. Ke ztrátě správné funkce těchto genů je potřeba, aby byly mutované nebo ztracené obě jejich alely. Proto jsou jedinci s jednou zděděnou mutovanou alelou tumor supresorového genu vystaveni vysokému riziku rozvoje CRC a to v poměrně nízkém věku. Pro její rozvoj je nutná jen jedna somatická mutace druhé alely daného genu v jakékoliv buňce organismu. Oproti tomu, proto-onkogeny jsou geny kódující proteiny, které se podílejí na stimulaci buněčného růstu nebo přežití buňky. Ve většině případů se jedná o proteiny ze skupiny růstových faktorů a jejich receptorů, signálních přenašečů, nebo transkripčních faktorů. Mutovaný proto-onkogen (označovaný jako onkogen) má zvýšenou transkripční aktivitu, jejímž výsledkem je nadprodukce zmíněných proteinů. Na rozdíl od tumor supresorových genů stačí mutace jedné alely proto-onkogenu k rozvoji tumorigeneze (shrnutí v Steele et al., 1998).

Vývoj CRC je vícestupňový proces, který postupně prochází histopatologickými změnami od benigních brzkých adenomů, přes adenokarcinomy, až po schopnost tvořit metastázy (Fearon and Vogelstein, 1990).

4.1 Dědičné syndromy

Dědičné syndromy jsou zodpovědné za přibližně 5 % všech případů vzniku CRC (Lal and Gallinger, 2000). Mezi ty nejvýznamnější patří familiární adenomatózní polypóza (FAP) a dědičný nepolypózní kolorektální karcinom (hereditary nonpolyposis colorectal cancer;

HNPCC), a to hlavně z toho důvodu, že jejich výzkum napomohl porozumět podstatě vzniku sporadických CRC (shrnutí v Kinzler and Vogelstein, 1996).

HNPCC, nebo také Lynchův syndrom, patří k autozomálně dominantně děděným onemocněním. Způsobují ho mutace v mutátorových genech kódujících proteiny, které opravují chyby vzniklé při replikaci DNA, tzv. „mismatch“, proto se nazývají geny MMR (mismatch-repair) (viz kapitola 4.2.2). Mezi nejčastěji mutované vedoucí ke vzniku HNPCC patří *Mut S homolog 2 (MSH2)* a *Mut L homolog 1 (MLH1)*. Polypy, výrůstky na sliznici, se při tomto onemocnění vyskytují jen zřídka a jsou špatně odlišitelné od polypů sporadických. Objevují se však v nižším věku a rychleji se zvrhnou v polypy rakovinné. U pacientů s HNPCC je 80% riziko vzniku CRC. Zvýšená je také predispozice pro vznik endometriálního karcinomu, rakoviny vaječníků, močového, ledvin nebo žaludku, přičemž počátek tohoto rakovinného bujení je vždy v poměrně v nižším věku, než je tomu při sporadických nádorech (shrnutí v Strate and Syngal, 2005; Syngal et al., 1999).

Na rozdíl od HNPCC je FAP charakterizována vznikem stovek až tisíců střevních adenomatózních polypů, často počínajícím už v adolescentním věku. Je to autozomálně dominantně děděný syndrom s téměř 100% pravděpodobností vzniku rakoviny u takto postiženého jedince. Způsobují ho různé zárodečné mutace v genu *APC*, které musí být pro rozvoj rakoviny následovány dalšími somatickými mutacemi (shrnutí v Lal and Gallinger, 2000).

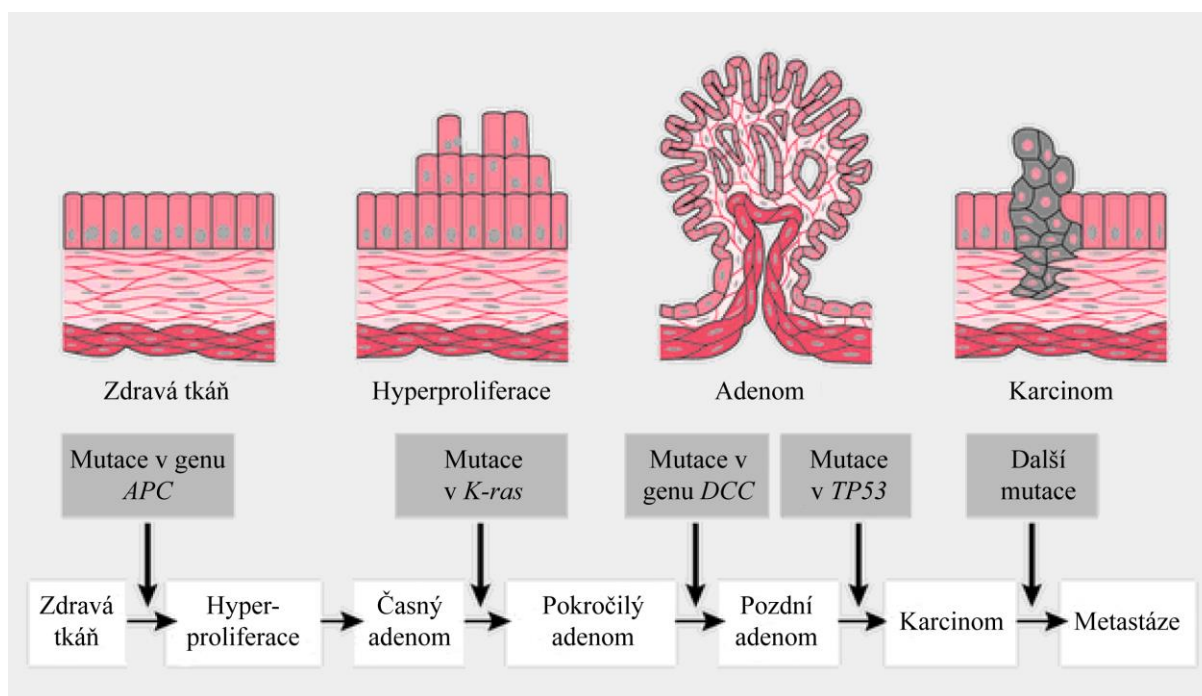
4.2 Sporadické nádory

V současné době jsou známy tři hlavní dráhy genomových změn vedoucí ke vzniku sporadických CRC. Nejčastější je chromozomální nestabilita (chromosomal instability; CIN), dále nestabilita mikrosatelitů (microsatellite instability; MSI), a poslední, fenotyp metylovaných ostrůvků CpG (CpG Island Methylator Phenotype; CIMP) (shrnutí v Bogaert and Prenen, 2014).

4.2.1 Chromozomální nestabilita

Chromozomální nestabilita, nebo také dráha vývoje adenom-karcinom (adenoma-karcinoma sequence), je výsledkem mutací vedoucích především k inaktivaci tumor-

supresorových genů jako *APC*, genu kódujícího protein *p53* (*TP53*), k aktivaci proto-onkogenu *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (*KRAS*), nebo ztrátě heterozygosity (loss of heterozygosity; LOH) na dlouhém raménku chromozomu 18 (18q) (shrnutí v Armaghany et al., 2012; viz Obrázek 3).



Obrázek 3: Klasický model karcinogeneze (podle Fearon and Vogelstein, 1990). Počátkem je mutace v *APC*, která může vést k hyperproliferaci střevního epitelu, jestliže k ní dojde v zárodečné buňce. Následné kumulativní mutace v dalších genech vedou ke vzniku malignit. Převzato z Aspinall and Taylor-Robinson, 2001.

APC je tumor supresorový gen, který se nachází na dlouhém raménku 5. chromozomu (Fearhead et al., 2001) a jeho produkt, protein APC, je součástí degradačního komplexu β -kateninu v signalizaci Wnt (viz kapitola 3.1). Mutace v *APC* je většinou jednou z prvních genetických změn v rozvoji tumorigeneze (Powell et al., 1992), přičemž ve více než třetině sporadických CRC jsou přítomny mutace obou alel tohoto genu (Lüchtenborg et al., 2005). Ztráta správné funkce APC vede ke stabilizaci β -kateninu a jeho hromadění v cytoplazmě. Poté, co β -katenin vstoupí do jádra buňky střevního epitelu, vytvoří komplex s transkripčním faktorem Tcf4, který je v těchto buňkách prominentním členem rodiny Tcf/Lef, a spustí nekontrolovanou transkripční aktivitu cílových genů dráhy Wnt (Korinek et al., 1997). Jedním z cílových genů této dráhy je proto-onkogen *c-MYC*, jehož zvýšená exprese podporuje neoplastický růst (He et al., 1998).

Nejen mutace v *APC*, ale i v dalších genech exprimujících komponenty signální dráhy Wnt, mohou vést k její hyperaktivaci a tím k rozvoji tumorigeneze. Mezi nejčastější patří mutace v genu *CTNGB1* kódujícím β -katenin, které způsobují změnu v místech pro jeho fosforylaci (Morin et al., 1997).

Produktem tumor supresorového genu *TP53* přítomného na krátkém raménku 17. chromozomu je protein p53, jehož funkcí je v případě poškození DNA zastavit buněčný cyklus a zprostředkovat opravu poškození, nebo navodit apoptózu buňky. Nesprávná funkce tohoto proteinu dovoluje buňkám s poškozenou DNA přežít a dále se dělit, a umožňuje nahromadění dalších mutací (shrnutí v Steele and Lane, 2005). Mutace v genu *TP53* jsou přítomny v mnoha typech lidských nádorů, a co se týče CRC, objevují se až v 60 % případů (Conlin et al., 2005; Hollstein et al., 1994).

Proto-onkogen *KRAS* lokalizovaný na krátkém raménku 12. chromozomu kóduje protein, který patří do rodiny RAS GTPáz. Tento protein je součástí MAPK signální dráhy, regulující buněčnou proliferaci, diferenciaci, senescenci a apoptózu. Nachází se na vnitřní straně plazmatické membrány, kde interaguje s membránovými receptory aktivovanými EGF z okolí buňky. *KRAS* ve své aktivované formě s navázaným GTP zprostředkuje přenos signálu dál do buňky a je okamžitě deaktivován hydrolýzou GTP a navázáním GDP. Mutace v *KRAS* však zabráňuje inaktivaci proteinu, čímž ve výsledku dochází ke zvýšené transkripci genů spojených s buněčnou proliferací (shrnutí v Armaghany et al., 2012; Castagnola & Giaretti, 2005). Mutace v genu *KRAS* jsou přítomny u přibližně 30 % pacientů s CRC (Conlin et al., 2005).

V některých CRC jsou pozorovány mutace v dalších genech, jejichž produkty se účastní signálních drah aktivovaných EGF. Mezi ně patří mutace v genu *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF)* kódující protein, který je součástí MAPK signální dráhy. Dále mutace v genu *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase, Catalytic subunit Alpha (PIK3CA)* kódující katalytickou podjednotku p110 α proteinu PI3K, nebo mutace v genu *Phosphatase and Tensin homolog (PTEN)*, jejichž produkty regulují množství fosfatidylinositol-3,4,5,-trifosfátu (Bunney and Katan, 2010; Oikonomou and Pintzas, 2006).

Další z příčin vedoucích ke vzniku sporadických CRC je ztráta jedné alely ve specifickém lokusu, LOH, zapříčiněna deleční mutací nebo ztrátou jednoho chromozomu

z chromozomového páru. K tomu často dochází na dlouhém raménku chromozomu 18, na kterém jsou přítomny geny *Deleted in Colorectal Cancer (DCC)*, kódující transmembránový receptor pro netrin, a geny *Smad2* a *Smad4* účastníci se signální dráhy TGF β (Tarafa et al., 2000; viz kapitola 3.5).

4.2.2 Nestabilita mikrosatelitů

Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetitivní sekvence rozptýlené v celém genomu. U člověka se vyskytují nejběžněji ve formě dinukleotidových repeticí cytosinu a adeninu. V oblasti mikrosatelitů může při replikaci DNA dojít ke sklouznutí DNA polymerázy a jejímu špatnému nasednutí na templát, což může způsobit ztrátu nebo prodloužení repetice. Těmto typům chyb předchází opravný systém MMR proteinů, který je rozpozná a opraví. Mutace v genech MMR však vedou k jejich nesprávné funkci a tím k MSI (Söreide et al., 2006; Thibodeau et al., 1993). V CRC se vyskytují mutace pěti klíčových genů MMR. Těmi nejčastěji mutovanými při vzniku sporadických nádorů jsou *MLH1* a *Post-meiotic segregation 2 (PMS2)* (Boland and Goel, 2010). Kromě toho, že MSI způsobuje HNPCC, je přítomna také v přibližně 15 % sporadických CRC (Söreide et al., 2006).

4.2.3 Metylace ostrůvků CpG

Metylace DNA je fyziologický proces s širokým spektrem funkcí zahrnující regulaci replikace i transkripce DNA. Je zprostředkována DNA metyltransferázou, která katalyzuje přenos metylové skupiny na cytosin v dinukleotidech CpG. Místa bohatá na tyto dinukleotidy, ostrůvky CpG, se nacházejí téměř výhradně v promotorech genů a jejich metylace vede k inaktivaci příslušných genů. Ostrůvky CpG se vyskytují také v promotorech mnoha tumor supresorových genů, u kterých bylo dokázáno, že jejich abnormální metylace může být jedním z potenciálních mechanismů karcinogeneze (shrnuto v Bettington et al., 2013). Jedním z takto epigeneticky inaktivovaných tumor supresorových genů je *Hypermethylated in cancer 1 (HIC1)*, kódující transkripční faktor, tzv. represor, který za normálních podmínek potlačuje transkripci. Bylo dokázáno, že k potlačování transkripce dochází také asociací HIC1 s dalšími transkripčními faktory za tvorby tzv. tělísek HIC1. Mezi transkripční faktory interagující s HIC1 patří i TCF4, součást signální dráhy Wnt/ β -katenin. Protein HIC1 tedy může řídit stimulaci transkripce genů cílových pro kanonickou signální

dráhu Wnt a jeho ztráta nebo inaktivace vede ke zvýšené expresi těchto genů (Valenta et al., 2006).

V CRC byla popsána jak nízká míra metylace stoupající s věkem, tak vysoká míra metylace ostrůvků CpG, která způsobuje inaktivaci genů a tím přispívá ke vzniku nádorů. Hypermethylace u nádorů s takto inaktivovanými geny, která se objevuje v přibližně 30 % případů CRC, byla nazvána CIMP. (Toyota et al., 1999). V relativně nedávné době byla popsána nová alternativní dráha vzniku CRC přes tzv. pilovité neoplázie (serrated neoplasia pathway), která je klasifikována v závislosti na stupni CIMP, různé míře MSI a výskytu mutací v genech *BRAF* nebo *KRAS* (Jass, 2007).

5. Genetické myší modely

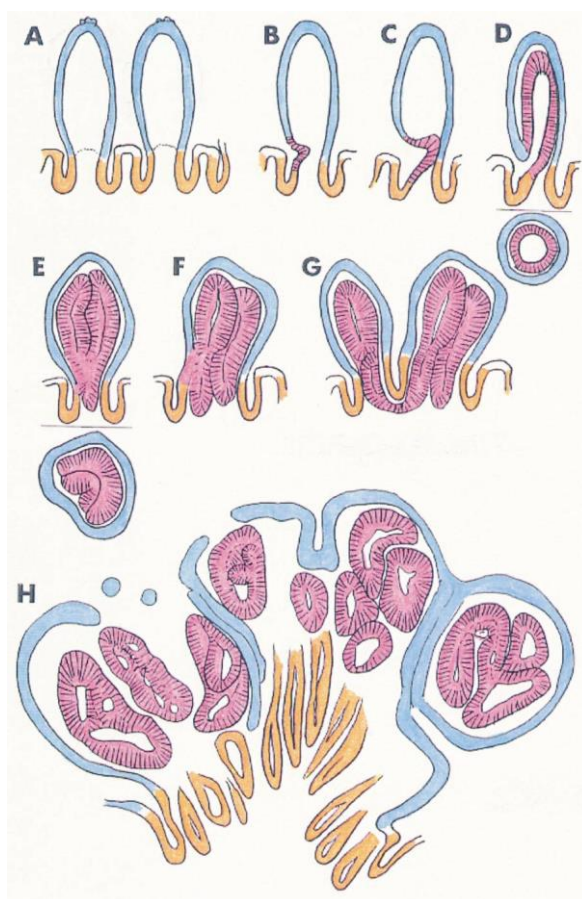
Geneticky upravené modelové organismy jsou nepostradatelným nástrojem nejen při výzkumu příčin vzniku nádorových onemocnění a jejich progresu, ale i při výzkumu a vývoji možných terapií. Laboratorní myš (*Mus musculus*) se v biomedicínských výzkumech stala jedním z nejlepších zvířecích modelů při výzkumu rakoviny střeva díky dobře známé genetické informaci a propracovaným technikám vývoje transgenních myší a myší se záměrně vyřazenými geny. Nejpoužívanějšími geneticky upravenými myšmi ve výzkumu CRC jsou ty s mutacemi v *Apc*, myším homologu lidského *APC* (Taketo and Edelmann, 2009).

5.1 Myší modely s mutacemi v *Apc*

Prvním modelem nesoucím mutaci v *Apc* byla myš, v jejímž střevě docházelo k tvorbě četných neoplázií, podle čehož byl tento mutant nazván Min (Multiple intestinal neoplasia), tedy *Apc^{Min}*. Histologický rozbor ukázal, že tyto neoplázie jsou adenomy, kterých se u heterozygotů s mutací *Min* (*Apc^{+Min}*) tvoří kolem sta převážně v tenkém střevě. Myši *Apc^{+Min}* jsou chudokrevné a nedožívají se více než 150 dní (Moser et al., 1990), homozygotita je oproti tomu letální už v časném embryonálním stádiu (Moser et al., 1995). Linie *Apc^{Min}* byla vytvořena z myších samců kmene C57BL/6, kteří byli ošetřeni etylnitrosomochovinou, jež indukovala vznik zárodečných mutací (Moser et al., 1990). Specifickým znakem *Apc^{Min}* je autozomálně dominantně děděná mutace v kodonu odpovídajícímu aminokyselině (AK) 850 (Leu) vedoucí ke vzniku stop kodonu. Výsledkem mutace je protein zkrácený z původních 2845 AK na 850 AK. Díky fenotypovým i genotypovým podobnostem mezi lidskou FAP a myší Min se staly *Apc^{Min}* nejen skvělým modelem pro výzkum FAP, ale i pro výzkum CRC obecně, jelikož mutace v *APC* je velmi často přítomna ve sporadických nádorech. (Su et al., 1992; viz kapitola 4.2). Oblíbeným nástrojem při výzkumu se tato linie stala také proto, že je jediným modelem s jednou genetickou změnou, která produkuje penetrantní stálý specifický fenotyp a kromě toho se adenomy ve střevech těchto myší tvoří rychle a léze jsou brzy viditelné (Kwong and Dove, 2009).

Podobným myším modelem je *Apc*^{A716}, u kterého je protein Apc zkrácen na 716 AK. Tento model má stejně jako *Apc*^{Min} původ v C57BL/6J. Homozygoti s touto mutací umírají rovněž v embryonálním stádiu. Oproti tomu, u heterozygotních myší dochází hned po narození k tvorbě střevních polypů, jejichž počet i velikost s věkem roste. Kolem 16. týdne se v celém gastrointestinálním traktu tvoří až 300 polypů, nejvíc však v tenkém střevě. Tyto polypy se skládají z mikroadenomů pokrytých normálním epitelem, u kterých bylo zjištěno, že ztratily druhou, nemutovanou alelu *Apc* (Oshima et al., 1995; viz Obrázek 4).

Díky těmto fenotypovým odlišnostem, u myší se zkráceným proteinem Apc, bylo dokázáno, že i zkrácený protein má schopnost různou mírou vázat β -katenin a tím přispívat k jeho degradaci (Gaspar and Fodde, 2004).



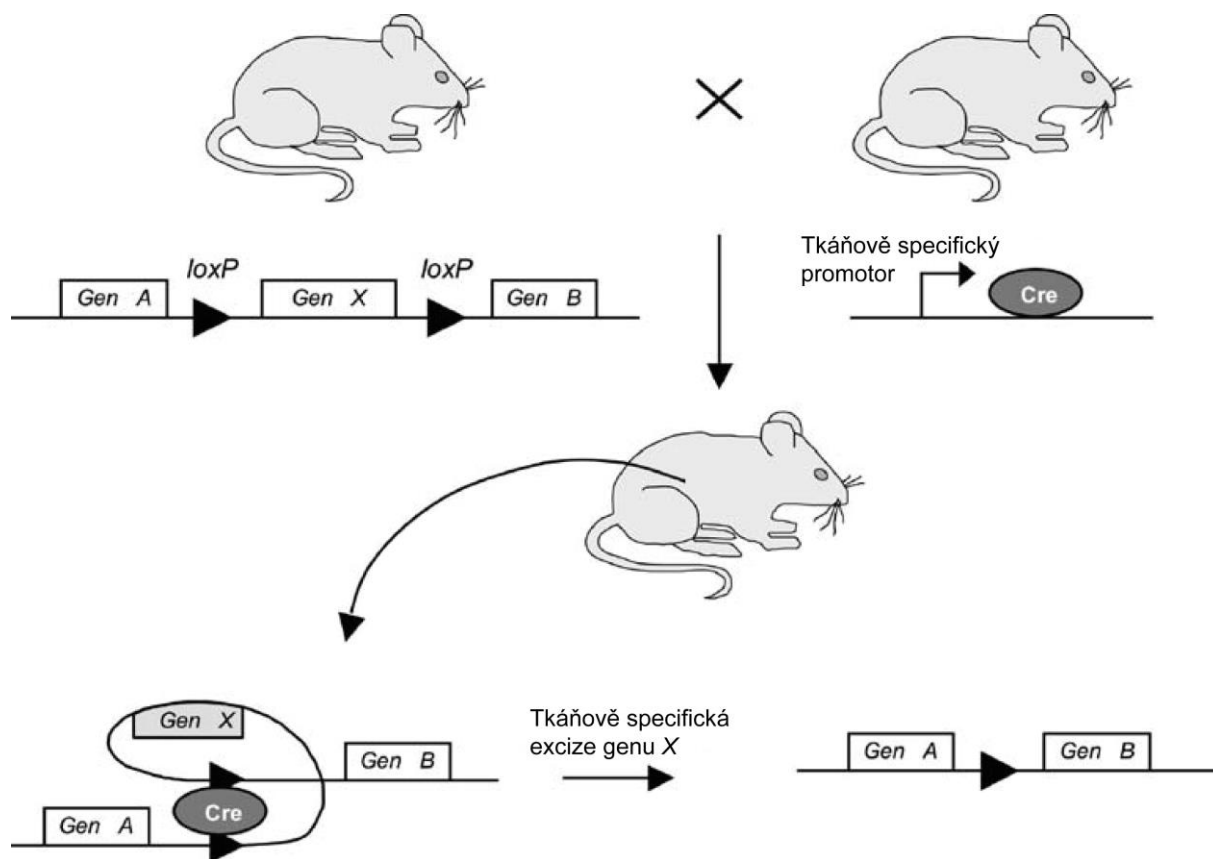
Obrázek 4: Vznik polypů v tenkém střevě heterozygotní myši *Apc*^{A716}. (A) Zdravý epitel krypt (žlutě) a klků (modře). (B-D) Vznik polypu (růžově) z proliferujících buněk, které se vtěsňují pod zdravý epitel klku. (E-G) Zvětšující se mikroadenomy. (H) Pozdní adenomy s částečně poškozeným epitelem klků. Převzato z Bienz and Clevers, 2000 (podle Oshima et al., 1997).

Dalšími modely jsou myši s mutacemi v kodonu odpovídajícímu AK 1638 v *Apc*. První z těchto mutací, *I638N*, byla vytvořena vložením expresní kazety pro neomycin v opačné transkripční orientaci do tohoto kodonu. V tlustém střevě heterozygotů, *Apc*^{+/I638N}, se kolem 10. týdne tvoří hyperplazie spojené s aktivní proliferací. Ve věku 20 týdnů se tvoří adenokarcinomy v tenkém střevě a ve 32 týdnech dochází k úmrtí těchto myší způsobenému rektálním krvácením. U myší, které přežijí víc než rok, se navíc můžou vytvořit nádory v tlustém střevě a žaludku. Homozygoti s touto mutací umírají v embryonálním stádiu krátce po zahnízdění v děloze (Fodde et al., 1994).

Druhá linie těchto myší, *I638T*, byla vytvořena vložením expresní kazety pro hygromycin do oblasti odpovídající kodonu 1638 ve stejné transkripční orientaci jako *Apc*. Výsledkem této mutace je exprese stabilního proteinu zkráceného na 182 kDa. Homozygoti ani heterozygoti s touto mutací ve střevě nemají přítomny žádné nádory. Pro homozygoty je však charakteristický opožděný růst a špatná životaschopnost (Smits et al., 1999).

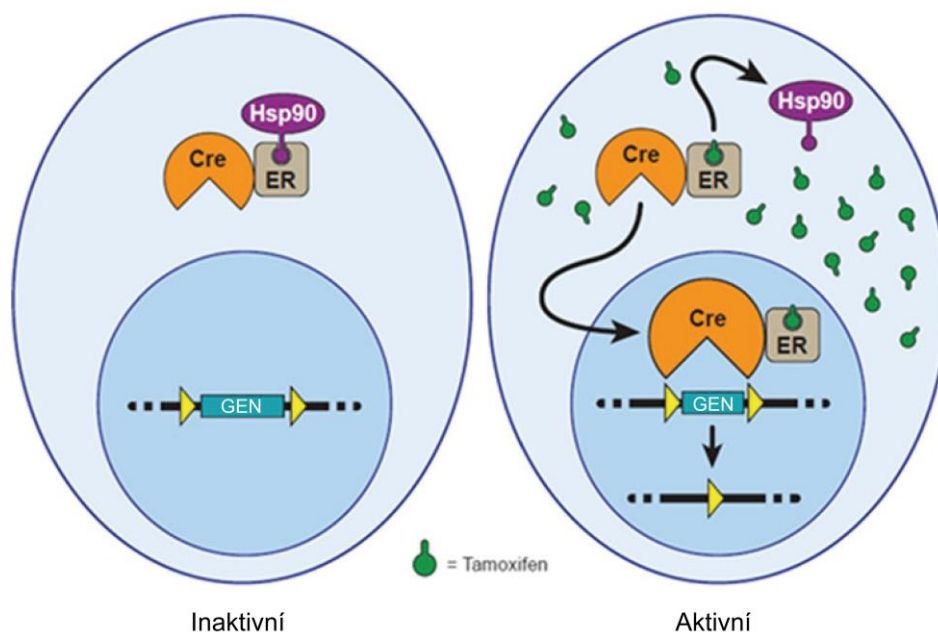
5.1.1 Myší modely s mutacemi v *Apc* vytvořenými pomocí systému *Cre-loxP*

Myši jsou dobrými modely pro studium vzniku lidských adenomů s výjimkou toho, že se adenomy u myší tvoří převážně v tenkém střevě, zatímco u lidí je výskyt adenomů takřka omezen na tlusté střevo jak u sporadických nádorů, tak u dědičných syndromů. Přesný důvod tohoto fenoménu však zatím není znám (van der Flier and Clevers, 2009). Také proto byly vytvořeny další myší linie pomocí systému *Cre-loxP*, který umožňuje specifické vyřazení cílových genů pouze v požadovaných buňkách. Cre (Cyclization recombination) je místně specifická DNA rekombináza produkována bakteriofágem P1, která rozpoznává lokus o velikosti 34 párů bazí v genomu tohoto bakteriofága nazvaný *loxP* (*locus of X-over of P1*). Rekombináza Cre katalyzuje reciprokou rekombinaci DNA mezi páry *loxP* ohraničujícími určitou genovou sekvenci. V závislosti na umístění a orientaci sekvence *loxP* může docházet k vyřazení, deleci, inverzi nebo translokaci genů, přičemž nejčastější mutací je právě delece. V praxi se delece genů založené na systému *Cre-loxP* dosahuje zkřížením dvou myších linií, z nichž jedna má cílový gen nebo jeho funkční exon ohraničen sekvencemi *loxP* a druhá nese tkáňově specificky exprimovanou rekombinázu Cre, jejíž transkripce je řízena nejčastěji z promotoru některého genu aktivního v daném typu buněk. Rekombinace tudíž proběhne jen v buňkách dané tkáně potomků těchto linií, cílové geny v buňkách tkání neexprimujících rekombinázu Cre zůstávají aktivní (shrnutí v Sauer, 1998; viz Obrázek 5).



Obrázek 5: Vytvoření tzv. knock-out myši pomocí systému Cre-loxP. Modifikace docílíme zkřížením myši nesoucí gen X, ohraničený dvěma sekvencemi *loxP*, s myši nesoucí rekombinázu Cre, regulovanou tkáňově specifickým promotorem (nahore). U potomků dochází k tkáňově specifickému vyštěpení genu X pomocí rekombinázy Cre (dole). Převzato z Claij and Peters, 2006.

Pro umožnění kontroly nad rekombinací byla rekombináza Cre modifikována fúzí s pozměněnou vazebnou doménou estrogenového receptoru (CreER) s afinitou pouze pro syntetický analog estrogenu, tamoxifen (resp. s jeho aktivním metabolitem, 4-hydroxytamoxifenem). V nepřítomnosti tamoxifenu je CreER udržována v cytoplasmě v neaktivní formě pomocí proteinu teplotního šoku 90 (heat shock protein 90; Hsp90). Po přidání tamoxifenu dochází k uvolnění CreER z Hsp90 a jejímu přemístění do jádra, kde rozpozná sekvence *loxP*, čímž se zahájí rekombinace (shrnutí v Cox et al., 2012; viz Obrázek 6).



Obrázek 6: Rekombináza Cre modifikována fúzí s ER. Za nepřítomnosti tamoxifenu je CreER zadržována v cytoplasmě pomocí Hsp90, k rekombinaci tudíž nedochází (vlevo). Přidaný tamoxifen se váže na ER, CreER se uvolní z Hsp90 a vstupuje do jádra, kde spouští rekombinaci (vpravo). Převzato z Cox et al., 2012.

Jedním z prvních vyvinutých myších modelů využívajících systém Cre-*loxP* je *Apc*^{580S}. Tato linie byla vytvořena ohraničením exonu 14 v genu *Apc* pomocí *loxP*. Rekombinace zde byla vyvolána lokální infekcí adenovirem exprimujícím rekombinázu Cre, čímž došlo k delecí lokusu a tím k posunu čtecího rámce. Ve výsledku se v kolorektální oblasti mutantní homozygotní myši začínají během 4 týdnů tvořit adenomy s delecí exonu 14 v *Apc*. Většina těchto myši se dožívá věku vyššího než jeden rok a to díky tkáňové a místně specifické lokalizaci vzniku těchto adenomů (Shibata et al., 1997).

Podobným modelem je myš s podmíněným vyřazením (conditional knock-out; CKO) genu *Apc* (*Apc*^{CKO}). Tato linie má dvěma *loxP* ohraničený exon 14 v *Apc* a navíc má vloženou neomycinovou kazetu ve stejné transkripční orientaci do intronu 14. Rekombinace vyvolána Cre vede k delecí exonu 14, tím k posunu čtecího rámce, a ve výsledku k expresi nefunkčního proteinu Apc zkráceného na 605 AK, z nichž prvních 580 AK odpovídá normálnímu proteinu Apc (Kuraguchi et al., 2006). Tento model může být zkřížen s myší exprimující CreER v rychle se dělících střevních kmenových buňkách, u jejichž potomků vyvolá jednorázová injekce tamoxifenu tvorbu nádorů v tenkém i tlustém střevě (Waalder et al., 2012).

5.2 Myší modely s mutacemi v genech MMR

Myší modely s mutacemi v genech MMR nesou nejčastěji inaktivované geny *Msh2*, *Msh6* a *Mlh1*, přičemž sklony k vývoji střevních nádorů mají homozygotní myši s oběma inaktivovanými alelami (Taketo and Edelmann, 2009).

Model s kompletní inaktivací genu *Msh2* byl vytvořený vložením kazety pro neomycinovou rezistenci do exonu 11 tohoto genu. U homozygotních myší, *Msh2*^{-/-}, se v 80 % případů tvoří lymfomy T-buněk, čemuž většinou do 8 měsíců věku podlehnou. U myší, které se dožívají věku kolem jednoho roku, se především v tenkém, ale i tlustém střevě tvoří adenokarcinomy, jejichž vznik je spojen se ztrátou *Apc*. U některých myší se také tvoří kožní neoplázie (Reitmair et al., 1996). Aby se předešlo vysoké úmrtnosti myší s lymfomy, byl vyvinut model s podmíněnou mutací pomocí systému Cre-*loxP* (Kucherlapati et al., 2010).

Homozygotní myš *Msh6*^{-/-} vykazuje podobný fenotyp jako *Msh2*^{-/-} s tím rozdílem, že v nádorech není pozorována MSI. Myši *Msh6*^{-/-} často tvoří lymfomy T- a B-buněk, stejně tak jako nádory v tenkém střevě. Jednoho roku se dožívá jen 35 % těchto myší (W Edelmann et al., 1997).

Buňky myší s kompletní inaktivací genu *Mlh1* naopak MSI vykazují. Homozygoti, *Mlh1*^{-/-}, se dožívají věku kolem jednoho roku a jedinci obou pohlaví nesoucí tuto mutaci jsou sterilní. V tenkém střevě těchto myší se tvoří adenokarcinomy, v T- i B-buňkách se tvoří lymfomy stejně jako u *Msh6*^{-/-} (Edelmann et al., 1999).

5.3 Myší modely s mutacemi v dalších genech

Jedním z dalších myších modelů je linie vytvořená ohraničením exonu 3 v genu *Catnb* (myší homolog genu *CTNNB1*), kódujícím β -katenin, dvěma sekvencemi *loxP*. Zkřížením této heterozygotní myši s myší exprimující rekombinázu Cre ve střevě dochází ke vzniku potomků s delecí exonu 3 v genu *Catnb*, který kóduje serin/threoninové zbytky β -kateninu, jež jsou fosforylovány kinázou GSK3 β (viz kapitola 3.1). Tato mutace vede k podobnému fenotypu

jako mutace v myších *Apc*^{A716}. Polypy se v tenkém střevě mutantní myši začínají tvořit už ve věku 3 týdnů (Harada et al., 1999).

Jiný myší model je založen na expresi mutované lidské formy genu *Kras* s aktivující záměnou Gly₁₂ za Val. Exprese tohoto genu, označovaného jako *Kras*^{V12G}, je pod kontrolou myšího villinového promotoru v tenkém i tlustém střevě. Způsobuje aktivaci MAPK signální dráhy, což vede k neregulované buněčné proliferaci. Transgenní myši *Kras*^{V12G} mají v 80 % případů vyvinuty 2-3 adenokarcinomy zejména v tenkém střevě. Přibližně ve 40 % nádorů byly navíc objeveny spontánní mutace v genu pro p53 (Janssen et al., 2002).

6. Chemické modely karcinogeneze ve střevě

Přestože se chemické modely karcinogeneze u myši liší od karcinogeneze u lidí, zejména kvůli jednorázovému podání vysoké dávky karcinogenů, jsou velmi oblíbeným nástrojem výzkumu iniciace a progresu nádorů. Tyto modely se dají snadno reprodukovat, jejich použití je možné na myších rozmanitých původů a dobře shrnují vývoj patogeneze v lidských CRC. Chemickými karcinogeny používanými k indukci vzniku střevních lézí jsou mj. heterocyklické a aromatické aminy, dimethylhydrazin (DMH) a jeho metabolit azoxymetan (AOM). Nenahraditelným se stal model, u kterého se po podání jedné dávky AOM týden podává dextran sulfát sodný (DSS) vyvolávající zánět (AOM/DSS). U tohoto modelu dochází k rychlému nástupu vzniku nádorů v tlustém střevě, jejichž průběh je porovnatelný s rozvojem lidských CRC (shrnutí v Robertis et al., 2011).

6.1 AOM

AOM je v játrech vznikajícím metabolitem dříve hojně používaného DMH, který je v játrech oxidován na azometan, z něhož se stává právě AOM. Jeho užívání se ve výzkumech procesů souvisejících se vznikem střevní karcinogeneze stalo oblíbeným hlavně díky své vyšší účinnosti oproti DMH. Používaný model vychází z 6 intraperitoneálních injekcí AOM v množství 7,5-10 mg/kg myši. Po injekci je AOM v játrech hydroxylován na metylazoxymetanol, který je se žlučí vylučován do střeva, kde se aktivuje na metyldiazonium způsobující metylaci guaninu v DNA. I když tyto změny po 6 měsících vyústí ve vývin obvykle 3-10 makroskopických nádorů, mortalita myši ošetřených AOM je obecně nízká (shrnutí v Neufert et al., 2007; Wolter & Frank, 1982). Nádory vyvolané AOM vykazují podobné znaky jako lidské CRC, např. abnormální funkci signální dráhy Wnt způsobenou mutacemi v genech pro APC nebo β -katenin (Maltzman et al., 1997; Takahashi et al., 2000), nebo mutace v genu *Kras* (Vivona et al., 1993). Oproti CRC však tyto nádory nemají velkou tendenci metastazovat (Neufert et al., 2007).

6.2 AOM/DSS

Model AOM/DSS je založen na jednorázové intraperitoneální injekci AOM (v množství 10 mg/kg zvířete), která je následována podáváním 2% DSS v pitné vodě po dobu jednoho týdne. Od 12. týdne po podávání DSS se v tlustém střevě začnou tvořit neoplázie a po 20 týdnech se v tlustém střevě všech myší vyvinou adenokarcinomy. Podání AOM v průběhu, nebo po podávání DSS nevede ke vzniku významného počtu neoplázií (Tanaka et al., 2003).

7. Závěr

Střevní epitel je jednou z nejrychleji obnovujících se tkání v našem těle. Jeho homeostáza je udržována populací kmenových buněk sídlících na bázi krypt tenkého i tlustého střeva, které dávají vznik jedné kmenové a jedné rychle se dělicí buňce. Tyto rychle se dělicí buňky diferencují v jeden z typů buněk střevního epitelu, z nichž každý zaujímá svou specifickou funkci.

Na řízení buněčné proliferace a diferenciaci a uspořádání buněk ve střevě se různou mírou podílejí četné signální dráhy, z nichž nejvýznamnější roli hraje dráha Wnt/ β -katenin, která je zodpovědná za regulaci proliferace kmenových buněk. Nesprávná funkce této signální dráhy může vést k rozvoji tumorigeneze.

Kolorektální karcinom je jedním z nejrozšířenějších nádorových onemocnění vůbec. Ve většině případů jsou za jeho rozvoj zodpovědné především somatické mutace vzniklé v průběhu života. Zděděné predispozice k rozvoji kolorektálního karcinomu má jen menšina pacientů s tímto nádorovým onemocněním. Mutace nalézáme v tumor supresorových genech, především v *APC*, který kóduje podstatnou součást signální dráhy Wnt/ β -katenin, nebo v tumor supresorovém genu *TP53*, dále v proto-onkogenech jako je *KRAS*, v genech nacházejících se na dlouhém raménku chromozomu 18, nebo v mutátorových genech. Důležitou roli při vzniku tumorigeneze také hraje hypermetylace ostrůvků CpG v promotorech tumor supresorových genů. Rakovina je výsledkem několika mutací nahromaděných v průběhu let.

Ke správnému pochopení změn odehrávajících se na molekulární úrovni slouží mutantní kmeny myší. Dosud bylo vyvinuto mnoho modelů a metod pro vývoj myší, v jejichž střevech je rozvoj nádorů podobný rozvoji nádorů u člověka, ovšem s tím rozdílem, že valná většina těchto modelů má sklony vytvářet nádory v tenkém střevě, kdežto u člověka se nádory tvoří především v kolorektální oblasti. I přes tyto rozdíly se díky myším modelům dosáhlo ve výzkumu značných úspěchů. Byly identifikovány různé příčiny patogeneze, stejně jako množství chemických látek, které by v budoucnu mohly najít své uplatnění v cílené léčbě. Vzhledem k rychlému rozvoji nádorů a omezené životnosti myší však model, který by přesně mimikoval také vznik metastáz ze střevních adenokarcinomů, stále ještě čeká na své objevení.

Seznam použité literatury

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., & Kemler, R. (1997). β -Catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *The EMBO Journal*, 16, 3797–804.
- Armaghany, T., Wilson, J. D., Chu, Q., & Mills, G. (2012). Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal Cancer Research*, 5, 19–27.
- Aspinall, R. J., & Taylor-Robinson, S. D. (2001). *Mosby's Color Atlas and Text of Gastroenterology and Liver Disease*. Mosby.
- Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 15, 19–33.
- Barker, N., Bartfeld, S., & Clevers, H. (2010). Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell*, 7, 656–70.
- Barker, N., & Clevers, H. (2010). Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology*, 138, 1681–96.
- Barker, N., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes & Development*, 22, 1856–64.
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., ... Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 449, 1003–7.
- Batlle, E., Henderson, J., & Beghtel, H. (2002). β -Catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell*, 111, 251–63.
- Bettington, M., Walker, N., Clouston, A., Brown, I., Leggett, B., & Whitehall, V. (2013). The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology*, 62, 367–86.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C., Hsieh, J., Wang, Y., Macke, J. P., ... Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature*, 382, 225–30.
- Bienz, M., & Clevers, H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, 103, 311–20.
- Biteau, B., & Jasper, H. (2011). EGF signaling regulates the proliferation of intestinal stem cells in Drosophila. *Development and Stem Cells*, 138, 1045–55.

- Bogaert, J., & Prenen, H. (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of Gastroenterology*, 27, 1–6.
- Boland, C. R., & Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138, 2073–87.
- Bunney, T. D., & Katan, M. (2010). Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN. *Nature Reviews Cancer*, 10, 342–52.
- Castagnola, P., & Giaretti, W. (2005). Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1756, 115–25.
- Claij, N., & Peters, D. J. M. (2006). Teaching molecular genetics: Chapter 2-Transgenesis and gene targeting: mouse models to study gene function and expression. *Pediatric Nephrology*, 21, 318–23.
- Conlin, A., Smith, G., Carey, F. A., Wolf, C. R., & Steele, R. J. C. (2005). The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut*, 54, 1283–6.
- Cox, B. C., Liu, Z., Lagarde, M. M. M., & Zuo, J. (2012). Conditional Gene Expression in the Mouse Inner Ear Using Cre-loxP. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 13, 295–322.
- Edelmann, W., Yang, K., Kuraguchi, M., Heyer, J., Lia, M., Kneitz, B., ... Kucherlapati, R. (1999). Tumorigenesis in Mlh1 and Mlh1/Apc1638N mutant mice. *Cancer Research*, 59, 1301–7.
- Edelmann, W., Yang, K., Umar, A., Heyer, J., Lau, K., Fan, K., ... Kucherlapati, R. (1997). Mutation in the mismatch repair gene Msh6 causes cancer susceptibility. *Cell*, 91, 467–77.
- Fearnhead, N., Britton, M. P., & Bodmer, W. F. (2001). The ABC of APC. *Human Molecular Genetics*, 10, 721–33.
- Fearon, E., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759–67.
- Flier, L. G. van der, & Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual Review of Physiology*, 71, 241–60.
- Fodde, R., Edelmann, W., Yang, K., van Leeuwen, C., Carlson, C., Renault, B., ... Kucherlapati, R. (1994). A targeted chain-termination mutation in the mouse Apc gene results in multiple intestinal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8969–73.
- Frisén, J., Holmberg, J., & Barbacid, M. (1999). Ephrins and their Eph receptors: multitasking directors of embryonic development. *The EMBO Journal*, 18, 5159–65.
- Gao, C., & Chen, Y.-G. (2010). Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cellular Signalling*, 22, 717–27.

- Gao, Z.-H., Seeling, J. M., Hill, V., Yochum, A., & Virshup, D. M. (2002). Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the β -catenin degradation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 1182–7.
- Gaspar, C., & Fodde, R. (2004). APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation. *International Journal of Developmental Biology*, 48, 377–386.
- Gerbe, F., Legrauerend, C., & Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 2907–17.
- Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M., & Taketo, M. M. (1999). Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the β -catenin gene. *The EMBO Journal*, 18, 5931–42.
- Hart, M. J., de los Santos, R., Albert, I. N., Rubinfeld, B., & Polakis, P. (1998). Downregulation of β -catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, β -catenin and GSK3 β . *Current Biology*, 8, 573–81.
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawal, L., da Costa, L. T., ... Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, 281, 1509–12.
- He, X. C., Zhang, J., Tong, W.-G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D. H., ... Li, L. (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt- β -catenin signaling. *Nature Genetics*, 36, 1117–21.
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., ... Harris, C. C. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Research*, 22, 3551–5.
- Cheng, H., & Leblond, C. P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *The American Journal of Anatomy*, 141, 461–79.
- Ingham, P. W., Nakano, Y., & Seger, C. (2011). Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nature Reviews. Genetics*, 12, 393–406.
- Itzkovitz, S., Lyubimova, A., Blat, I. C., Maynard, M., van Es, J., Lees, J., ... van Oudenaarden, A. (2012). Single-molecule transcript counting of stem-cell markers in the mouse intestine. *Nature Cell Biology*, 14, 106–14.
- Janssen, K., Marjou, F. El, Pinto, D., Sastre, X., Rouillard, D., Fouquet, C., ... Robine, S. (2002). Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. *Gastroenterology*, 123, 492–504.
- Jass, J. R. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 50, 113–30.
- Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87, 159–70.

- Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., ... Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science*, 275, 1784–7.
- Kosinski, C., Li, V. S. W., Chan, A. S. Y., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W. Y., ... Chen, X. (2007). Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 15418–23.
- Kosinski, C., Stange, D. E., Xu, C., Chan, A. S., Ho, C., Yuen, S. T., ... Chen, X. (2010). Indian hedgehog regulates intestinal stem cell fate through epithelial-mesenchymal interactions during development. *Gastroenterology*, 139, 893–903.
- Krausova, M., & Korinek, V. (2012). Signal transduction pathways participating in homeostasis and malignant transformation of the intestinal tissue. *Neoplasia*, 59, 708–18.
- Kucherlapati, M. H., Lee, K., Nguyen, A. A., Clark, A. B., Hou, H., Rosulek, A., ... Edelmann, W. (2010). An Msh2 conditional knockout mouse for studying intestinal cancer and testing anticancer agents. *Gastroenterology*, 138, 993–1002.
- Kuraguchi, M., Wang, X.-P., Bronson, R. T., Rothenberg, R., Ohene-Baah, N. Y., Lund, J. J., ... Kucherlapati, R. (2006). Adenomatous Polyposis Coli (APC) is required for normal development of skin and thymus. *PLoS Genetics*, 2, 1362–74.
- Kwong, L. N., & Dove, W. F. (2009). APC and its modifiers in colon cancer. *APC Proteins*, 85–106.
- Lal, G., & Gallinger, S. (2000). Familial adenomatous polyposis. *Seminars in Surgical Oncology*, 18, 314–23.
- Lièvre, A., Blons, H., & Laurent-Puig, P. (2010). Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. *Oncogene*, 29, 3033–43.
- Logan, C. Y., & Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 781–810.
- Lüchtenborg, M., Weijenberg, M. P., Wark, P. a, Saritas, A. M., Roemen, G. M. J. M., van Muijen, G. N. P., ... de Goeij, A. F. P. M. (2005). Mutations in APC, CTNNB1 and K-ras genes and expression of hMLH1 in sporadic colorectal carcinomas from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer*, 5, 160.
- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, 17, 9–26.
- Maltzman, T., Whittington, J., Driggers, L., Stephens, J., & Ahnen, D. (1997). AOM-induced mouse colon tumors do not express full-length APC protein. *Carcinogenesis*, 18, 2435–9.

- Marshman, E., Booth, C., & Potten, C. S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 24(1), 91–8.
- Miller, J. (2001). The Wnts. *Genome Biology*, 3, 1–15.
- Miyazono, K., Kamiya, Y., & Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *Journal of Biochemistry*, 147, 35–51.
- Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1997). Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science*, 275, 1787–90.
- Moser, A. R., Pitot, H. C., & Dove, W. F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science*, 247, 322–4.
- Moser, A. R., Shoemaker, A. R., Connelly, C. S., Clipson, L., Gould, K. A., Luongo, C., ... Gardner, R. L. (1995). Homozygosity for the Min allele of Apc results in disruption of mouse development prior to gastrulation. *Developmental Dynamics*, 203, 422–33.
- Neufert, C., Becker, C., & Neurath, M. F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nature Protocols*, 2, 1998–2004.
- Oikonomou, E., & Pintzas, A. (2006). Cancer genetics of sporadic colorectal cancer: BRAF and PI3KCA mutations, their impact on signaling and novel targeted therapies. *Anticancer Research*, 26, 1077–84.
- Oshima, H., Oshima, M., Kobayashi, M., Tsutsumi, M., & Taketo, M. M. (1997). Morphological and molecular processes of polyp formation in Apc Δ 716 knockout mice. *Cancer Research*, 57, 1644–9.
- Oshima, M., Oshima, H., Kitagawa, K., Kobayashi, M., Itakura, C., & Taketo, M. (1995). Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4482–6.
- Potten, C. S., Kovacs, L., & Hamilton, E. (1974). Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. *Cell Tissue Kinetics*, 7, 271–83.
- Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., ... Kinzler, K. W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 359, 235–7.
- Ranganathan, P., Weaver, K. L., & Capobianco, A. J. (2011). Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nature Reviews. Cancer*, 11, 338–51.
- Reitmair, A. H., Redston, M., Cai, J. C., Chuang, T. C. Y., Bjerknes, M., Cheng, H., ... Mak, Tak, W. (1996). Spontaneous intestinal carcinomas and skin neoplasms in Msh2-deficient mice. *Cancer Research*, 56, 3842–9.

- Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, *434*(7035), 843–50.
- Robertis, M. De, Massi, E., Poeta, M. L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., ... Fazio, V. M. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *Journal of Carcinogenesis*, *10*, 9.
- Rothenberg, M. E., Nusse, Y., Kalisky, T., Lee, J. J., Dalerba, P., Scheeren, F., ... Clarke, M. F. (2012). Identification of a cKit(+) colonic crypt base secretory cell that supports Lgr5(+) stem cells in mice. *Gastroenterology*, *142*, 1195–205.
- Sangiorgi, E., & Capecchi, M. R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nature Genetics*, *40*, 915–20.
- Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., ... Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, *469*, 415–8.
- Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods*, *14*, 381–92.
- Shibata, H., Toyama, K., Shioya, H., Ito, M., Hirota, M., Hasegawa, S., ... Noda, T. (1997). Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science*, *278*, 120–3.
- Smits, R., Kielman, M. F., Breukel, C., Zurcher, C., Neufeld, K., Jagmohan-Changur, S., ... Fodde, R. (1999). Apc 1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. *Genes & Development*, *13*, 1309–21.
- Söreide, K., Janssen, E. a M., Söiland, H., Körner, H., & Baak, J. P. a. (2006). Microsatellite instability in colorectal cancer. *The British Journal of Surgery*, *93*, 395–406.
- Steele, R. J. C., & Lane, D. P. (2005). p53 in cancer: A paradigm for modern management of cancer. *The Surgeon*, *3*, 197–205.
- Steele, R. J. C., Thompson, A. M., Hall, P. A., & Lane, D. P. (1998). The p53 tumour suppressor gene. *British Journal of Surgery*, *85*, 1460–7.
- Strate, L. L., & Syngal, S. (2005). Hereditary colorectal cancer syndromes. *Cancer Causes and Control*, *16*, 201–13.
- Su, L. K., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Preisinger, A. C., Moser, A. R., Luongo, C., ... Dove, W. F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science*, *256*, 668–70.
- Syngal, S., Fox, E. A., Li, C., Dovidio, M., Eng, C., Kolodner, R. D., & Garber, J. E. (1999). Interpretation of genetic test results for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA*, *281*, 247–53.

- Takahashi, M., Nakatsugi, S., Sugimura, T., & Wakabayashi, K. (2000). Frequent mutations of the β -catenin gene in mouse colon tumors induced by azoxymethane. *Carcinogenesis*, *21*, 1117–20.
- Taketo, M. M., & Edelmann, W. (2009). Mouse models of colon cancer. *Gastroenterology*, *136*, 780–8.
- Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., & Mori, H. (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Science*, *94*, 965–73.
- Tarafa, G., Villanueva, A., Farré, L., Rodríguez, J., Musulén, E., Reyes, G., ... Capellá, G. (2000). DCC and SMAD4 alterations in human colorectal and pancreatic tumor dissemination. *Oncogene*, *19*, 546–55.
- Thibodeau, S. N., Bren, G., & Schaid, D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*, *260*, 816–9.
- Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K. G., Rangell, L., Klein, O. D., & de Sauvage, F. J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, *478*, 255–9.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., & Issa, J.-P. J. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *96*, 8681–6.
- Valenta, T., Lukas, J., Doubravska, L., Fafulek, B., & Korinek, V. (2006). HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and β -catenin to the nuclear bodies. *The EMBO Journal*, *25*, 2326–37.
- Van der Flier, L. G., & Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual Review of Physiology*, *71*, 241–60.
- VanDussen, K. L., Carulli, A. J., Keeley, T. M., Patel, S. R., Puthoff, B. J., Magness, S. T., ... Samuelson, L. C. (2012). Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development and Stem Cells*, *139*, 488–97.
- Vivona, A. A., Shpitz, B., Medline, A., Bruce, W. R., Hay, K., Ward, M. A., ... Gallinger, S. (1993). K-ras mutations in aberrant crypt foci, adenomas and adenocarcinomas during azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, *14*, 1777–81.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics*, *9*, 138–41.
- Vries, R. G. J., Huch, M., & Clevers, H. (2010). Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Molecular Oncology*, *4*, 373–84.
- Waler, J., Machon, O., Tumova, L., Dinh, H., Korinek, V., Wilson, S. R., ... Krauss, S. (2012). A novel tankyrase inhibitor decreases canonical Wnt signaling in colon

carcinoma cells and reduces tumor growth in conditional APC mutant mice. *Cancer Research*, 72, 2822–32.

Wehrli, M., Dougan, S. T., Caldwell, K., O’Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., ... DiNardo, S. (2000). arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature*, 407, 527–30.

Wolter, S., & Frank, N. (1982). Metabolism of 1,2-dimethylhydrazine in isolated perfused rat liver. *Chem. Biol. Interact.*, 42, 335–44.

Yan, K., Chia, L., Li, X., Ootani, A., Su, J., Lee, J. Y., ... Kuo, C. J. (2012). The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 466–71.